

RNAi 沉默 GALNT7 基因对宫颈癌细胞恶性行为的影响

彭瑞清 门剑龙 任静

作者单位:300052 天津市,天津医科大学总医院临床检验科

【摘要】 目的 探讨多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 7 (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7, GALNT7) 基因对宫颈癌细胞生长、侵袭及迁移能力的影响。**方法** 利用 RNA 干扰技术沉默 GALNT7 (siR-GALNT7), 以非特异性序列 (pSilencer 2.1) 转染细胞作为阴性对照, 转染宫颈癌细胞 HeLa 和 C33A 细胞, 采用 MTT 实验、集落形成实验、Transwell 侵袭实验以及细胞划痕实验来检测干扰 GALNT7 基因后宫颈癌细胞生长、侵袭以及转移能力的变化。**结果** Western Blot 检测结果显示, 转染 siR-GALNT7 质粒的实验组中两种宫颈癌细胞中 GALNT7 的蛋白表达水平明显降低, 与转染 siR-Ctrl 的对照组比较, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); siR-GALNT7 使 HeLa 和 C33A 细胞生长活性分别下降了 19% 和 22%, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); siR-GALNT7 使 HeLa 和 C33A 细胞的集落形成能力分别下降了 56% 和 52%, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); siR-GALNT7 使 HeLa 和 C33A 细胞侵袭能力分别下降了 48% 和 54%, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); siR-GALNT7 使 HeLa 细胞迁移能力下降了约 30%, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** RNA 干扰在体外明显降低了宫颈癌细胞中 GALNT7 基因的表达, 同时抑制了宫颈癌细胞的生长侵袭以及迁移能力, GALNT7 基因有可能成为宫颈癌基因治疗的重要靶点。

【关键词】 宫颈癌细胞; 多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶 7; RNA 干扰

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.03.005

The influence of RNAi on expression of GALNT7 to malignancy behaviours of cervical cancer cells

PENG Rui-qing, MEN Jian-long, REN Jing. Department of Clinical Laboratory, the General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GALNT7) gene to growth, invasiveness and migration of cervical cancer cells. **Methods** GALNT7 gene was silenced by RNA interference, took non-specificity sequence pSilencer 2.1 as negative control. After transfection of cervical cancer cells (HeLa and C33A cells), Western Blot was used to detect protein expression of GALNT7 gene, the growth ability was detected by MTT assay, the ability to form colonies was evaluated by the colony formation assay, the invasion and migration ability were detected by matrigel invasion assay. **Results** In experimental group the protein expression of GALNT7 was decreased significantly than that of control group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). MTT assay revealed that cell growth was inhibited, the inhibitory rates were decreased by 19% in HeLa cells and 22% in C33A cells, and compared with control group, the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). The ability to form colonies in experimental group were inhibited by 56% in HeLa cells and 52% in C33A cells than that of control group, and the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). In experimental group, the inhibitory rates on invasion were decreased by 48% in HeLa cells and 54% in C33A cells, and the inhibitory rate on migration was decreased by 30% in HeLa cells, and compared with control group, the differences all had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** RNAi mediated GALNT7 down-regulation can inhibit the growth, invasion and migration of cervical cancer, and can be an important target to cervical cancer gene-therapies.

【Key words】 Cervical cancer cell; Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7; RNA interference

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,在世界范围内发病率在女性肿瘤中居第二位,仅

次于乳腺癌,每年约有超过 50 万新发病例,病死率达 40%^[1]。关于宫颈癌的发生原因,目前认为除了与

性生活次数频繁、吸烟以及免疫功能失调有关外,主要与人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染相关,但其确切的病因至今仍未明确^[2,3]。本研究前期发现多肽-N-乙酰氨基半乳糖转移酶 7(polypecti-N-acetylgalactosaminyltransferase 7, GALNT7)在宫颈癌组织中表达水平显著升高。GALNT7 是多肽 N-乙酰氨基半乳糖转移酶(UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T or GALNT)家族中的一员,可以将 N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)结合到蛋白质肽链的 Ser 或者 Thr 上,是催化蛋白质 O-糖基化修饰的起始糖基转移酶^[4]。因为 O-连接的糖基化过程是连续的,丝氨酸或者苏氨酸上 GalNAc 的增加代表了黏蛋白生物合成的第一步,尽管看起来简单,但是多个 GALNT 家族成员似乎在使其蛋白底物完全糖基化中起到了关键的作用。异常的糖基化是人类很多肿瘤发生的标志并且已经证明和细胞生长、分化、转移、黏附以及免疫监视都有密切的联系^[5]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是利用双链 RNA 探针对同源的 mRNA 起作用,引起核苷酸内部剪切和降解,从而抑制目标基因的表达。本研究采用 RNAi 技术,通过抑制高表达 GALNT7 的宫颈癌细胞中 GALNT7 的表达,反向探讨 GALNT7 与宫颈癌细胞的生长与侵袭的相关性,从而为宫颈癌转移的诊断和治疗提供可能的基因治疗方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株和质粒 人宫颈癌细胞系 HeLa 和 C33A 购自天津医科大学生命科学中心实验室。含 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640,置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。对照质粒 pSilencer 2.1 以及干扰质粒 pSilencer/GALNT7-shRNA 均由天津医科大学汤华教授惠赠。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基及胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司)、胎牛血清(中国医学科学院血液学研究所)、脂质体 lipofectamine 2000 转染试剂及无血清培养基 Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司)、兔源抗-GALNT7 抗体及 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(天津赛尔生物技术有限公司)、兔源抗-GAPDH 抗体(德国 SIGMA-ALDRICH 公司)、BioTraceNT 硝酸纤维素膜(美国 Millipore 公司)、SuperRX 感光胶片(日本 FUJIFILM 公司)、Transwell 侵袭小室(美国 Corning 公司)。

1.3 方法

1.3.1 质粒转染 采用脂质体转染法。实验分两组进行:分别转染对照质粒 siR-Ctrl(pSilencer 2.1)以及干扰质粒 siR-GALNT7(pSilencer/GALNT7-shRNA)。转染前一天,以 1×10^6 /mL 传代 HeLa 细胞及 2×10^6 /mL 传代 C33A 细胞于 100 ml 培养瓶中,待细胞生长至 60%~80%时,以 1 ml 无血清培养基+10 μ g 质粒+10 μ l 脂质体 Lipofectamine 2000 转染细胞。转染后 4 h,再添加 1 ml 新鲜含 10%胎牛血清的完全培养基。转染 24 h 后全部换为新鲜的含 10%胎牛血清的完全培养基。

1.3.2 Western Blot 检测 GALNT7、GAPDH 蛋白表达 转染后 48 h 将细胞原培养液弃掉,用细胞裂解液提取细胞的总蛋白。总蛋白经过 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后,半湿电转移到硝酸纤维素膜形成印迹,将膜置于含对应一抗(兔源抗-GALNT7 抗体或兔源抗-GAPDH 抗体)的 5%脱脂奶粉中室温封闭 2 h。漂洗后将膜置于含对应二抗(HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体或 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体)的 5%脱脂奶粉中,室温避光缓慢摇动作用 1.5 h。暗室内,定影液定影,显影液显影,曝光于 X 光片上。胶片用 LabWorksTM 凝胶成像及分析系统进行摄像,分析各组 GALNT7 条带的亮度值,以 GAPDH 为内参,比较各组间校正后的 GALNT7 条带亮度值的关系,并以转染 siR-Ctrl 的细胞组为标准值 1,计算转染 siR-GALNT7 组 GALNT7 条带亮度的相对值并绘制柱状图。

1.3.3 细胞生长活性检测 将转染 24 h 后的 HeLa 细胞以每孔 1×10^3 个(C33A 细胞每孔 2×10^3 个)接种于 96 孔板上,每组接种 5 孔,共接种 3 个 96 孔板,以后每 24 h 随机选择一组,利用四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法,在酶标仪进行检测,选择 570 nm 波长,测定吸光度值(A570)。

1.3.4 集落形成实验 检测细胞的集落形成能力 转染后 48 h,将 HeLa 细胞以每孔 150 个(C33A 细胞以每孔 300 个)接种于 12 孔板上,每组接种 3 个复孔。在培养期间,每 3 d 更换一次培养液,从接种 12 孔板后的第 6 天开始每天观察各孔的细胞集落数,以细胞数 ≥ 50 个作为集落形成的标准,直至接种 12 孔板后集落之间发生互相融合后结束培养。用 2%结晶紫染料室温染色 10 min,弃去染液,冲洗后观察集落形成情况。

1.3.5 细胞体外侵袭能力的检测 细胞侵袭重建基底膜实验在 Transwell 小室进行。Matrigel 凝胶经重建后能在聚碳酸酯膜表面形成类似天然基底膜的结

构,细胞侵袭穿过重建的 Matrigel 凝胶的能力反映该细胞的侵袭能力。Matrigel 凝胶用无血清 RPMI 1640 培养液稀释成为 2 mg/mL,在滤膜上表面加入 40 μ l,37 $^{\circ}$ C 培养 4 h,形成胶状。将转染后的细胞消化并计数,取 5×10^4 个 HeLa 细胞或者 1.3×10^5 个 C33A 细胞置于 1.5 ml EP 管中,以离心半径 12.5 cm,2000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,以 200 μ l 无血清的 RPMI 1640 培养液重悬细胞后加入 Transwell 侵袭小室的上室,含 15% 胎牛血清的培养液 600 μ l 加入下室。37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养 36 h,用棉签擦去小室内未穿过滤膜的肿瘤细胞,结晶紫染色后用镊子将滤膜揭下,封片剂封于载玻片上,显微镜下每室随机选取 5 个视野拍照计数穿过小室底膜的细胞,计算平均值,每个样本重复 3 次。

1.3.6 划痕实验 取 24 孔板,每孔接种约 5×10^4 个 HeLa 细胞,转染后培养 24 h 后,用 10 μ l 移液器吸头贴着直尺,垂直于板底划痕,PBS 冲洗 3 次后,加入 2% 胎牛血清的培养液,分别于划痕后 0 h 和 36 h 拍照,并测量划痕宽度。每个样本重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行处理,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western Blot 检测 GALNT7 蛋白表达的检测结果 由图 1 可以看出,RNAi 48 h 后,两种宫颈癌细胞中 GALNT7 蛋白表达在转染 siR-GALNT7 的实验组较转染 siR-Ctrl 的对照组明显降低,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

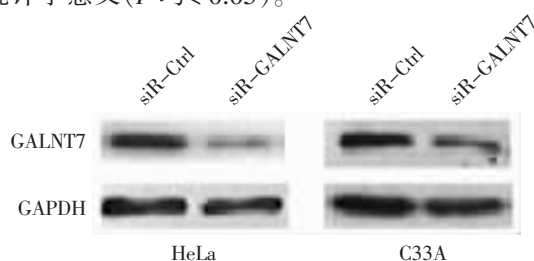


图 1A 转染 siR-GALNT7 质粒及

其对照 siR-Ctrl 后 GALNT7 蛋白表达水平代表图

2.2 RNAi 后细胞生长活性变化检测结果 MTT 结果显示,转染后实验组细胞生长活性较对照组相比明显减弱,HeLa 细胞下降了约 19%,C33A 细胞下降了约 22%,且差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),见图 2。

2.3 RNAi 后宫颈癌细胞集落形成能力的变化 由图 3 可见,转染 siR-GALNT7 的实验组和转染 siR-Ctrl 的对照组相比,细胞集落形成率明显下降,HeLa

细胞下降了约 56%,C33A 细胞下降了约 52%,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

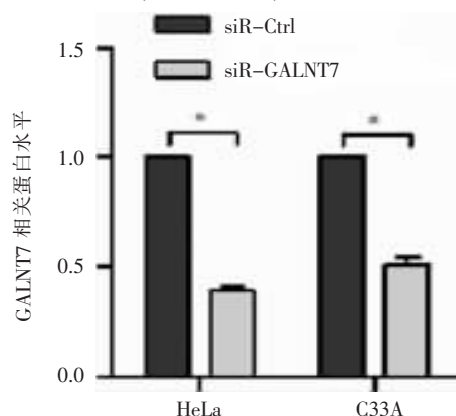


图 1B 图 1A 情况的定量分析图

注:*两组比较, $P < 0.05$

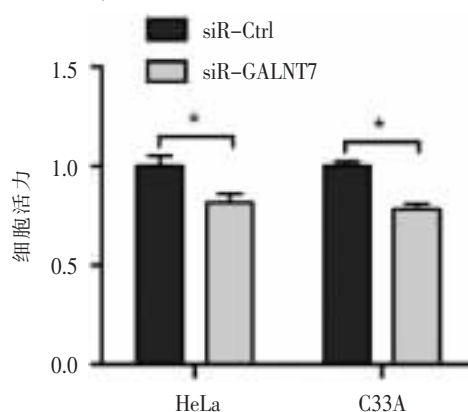


图 2 MTT 实验分析

siR-GALNT7 对宫颈癌细胞生长活性的影响

注:*两组比较, $P < 0.05$

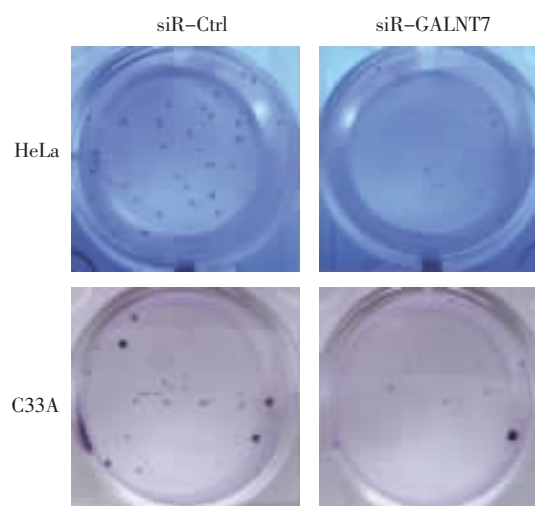


图 3A 各组细胞集落形成结晶紫染色代表图

2.4 RNAi 后宫颈癌细胞侵袭能力的变化 Transwell 侵袭实验结果显示,与对照组相比,实验组宫颈癌细胞的侵袭能力受到了抑制,HeLa 细胞下降了约 48%,C33A 细胞下降了约 54%,差异均有统计学

意义(P 均 <0.05), 见图 4。

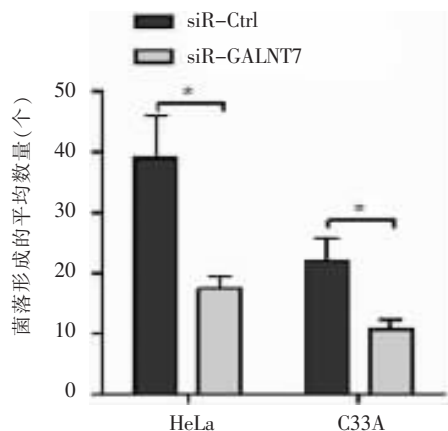


图 3B 结晶紫染色后细胞集落计数的定量分析

注: *两组比较, $P<0.05$

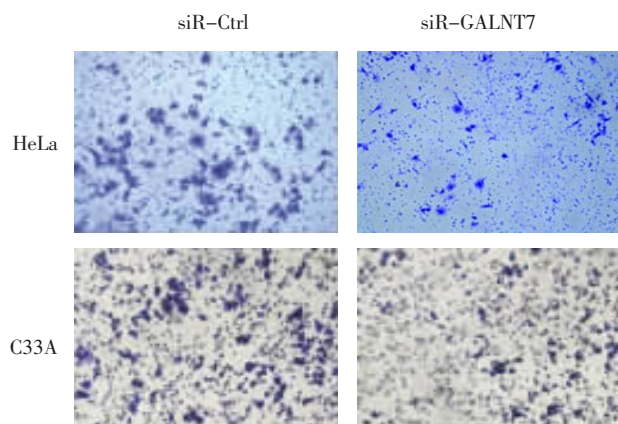


图 4A Transwell 侵袭实验

siR-GALNT7 对宫颈癌细胞侵袭能力影响图(400×)

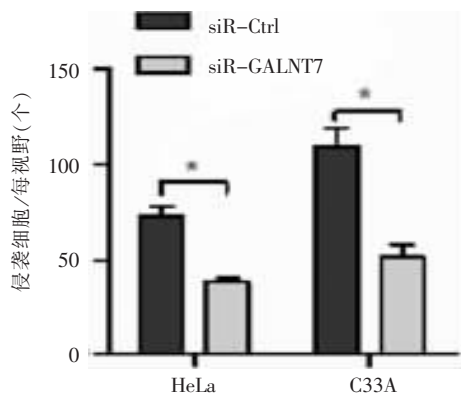


图 4B 显微镜下每个视野平均膜细胞数的定量分析

注: *两组比较, $P<0.05$

2.5 宫颈癌细胞迁移能力变化检测结果 RNAi 后的迁移实验结果显示, 细胞划痕实验后 36 h, HeLa 细胞迁移的距离较对照组迁移的距离下降了约 30%, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 5。

3 讨论

宫颈癌是指发生在子宫阴道部及宫颈管的恶性肿瘤, 又称子宫颈癌。研究^[6,7]资料表明, 宫颈癌的发

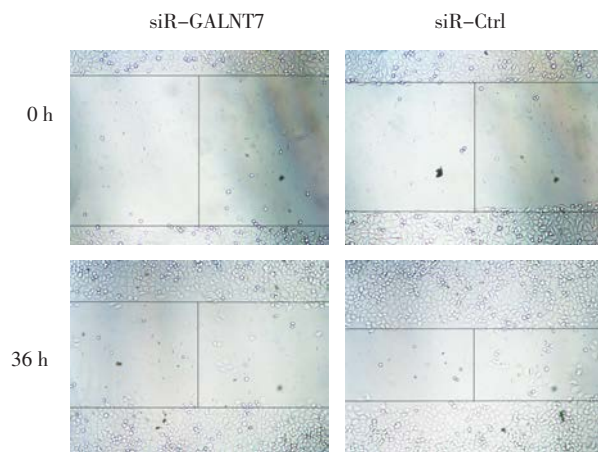


图 5A 细胞划痕实验显微镜下

两组 HeLa 细胞 0 h 和 36 h 的代表图(400×)

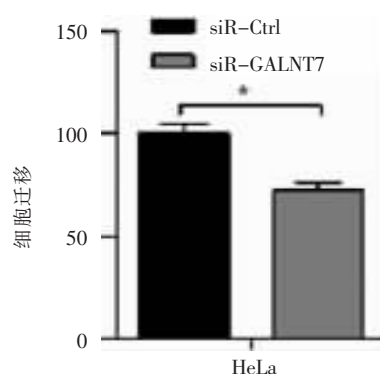


图 5B 宫颈癌细胞迁移能力的定量分析图

注: *两组比较, $P<0.05$

生是一个多因素、多步骤、多阶段的发展过程, 涉及许多癌基因、抑癌基因和转移相关基因等的变化。宫颈癌的恶性转化过程是在多个基因的协同调控下发生的。包括宫颈癌在内的妇科恶性肿瘤严重威胁女性健康, 目前已有许多运用 RNAi 技术治疗妇科恶性肿瘤的研究报道^[8]。鉴于宫颈癌对女性带来的巨大危害, 越来越多的学者倾向于研究宫颈癌发生发展的分子机制。

RNAi 是实验室中一种强大的实验工具, 其原理是利用同源性的双链 RNA 诱导序列特异的目标基因的沉默, 从而抑制其蛋白的表达。在体外细胞培养和动物实验中, 采用小干扰 RNA 或病毒表达载体的方法均取得了较好的沉默效果。本文前期研究发现, GALNT7 在宫颈癌组织中表达水平显著升高, 为了进一步研究并验证基因 GALNT7 对宫颈癌细胞表型的影响, 本文研究利用 RNAi 技术将内源性 GALNT7 基因表达沉默后, 进行了一系列的实验研究(如 MTT 实验、集落形成实验、Transwell 迁移和细胞划痕实验)。

MTT 实验是检测细胞增殖速度和增殖活性的

常用方法,本文研究利用 MTT 实验方法,检测到宫颈癌细胞系 HeLa 细胞和 C33A 细胞转染 siR-GALNT7 后细胞生长活性与对照组相比明显减低,表明 siR-GALNT7 起到抑制细胞生长活性的作用。另一方面,细胞集落形成实验也是测定细胞生存和独立增殖能力的有效实验方法。在体外培养时,由单个细胞增殖形成的细胞群成为集落(克隆),癌细胞或发生恶性转化的细胞培养时,集落形成的能力比正常细胞强。通过计数>50 个细胞的细胞集落数,能够了解细胞的增殖能力和独立生长能力。本文研究结果表明,转染 siR-GALNT7 的 HeLa 细胞和 C33A 细胞的集落形成能力亦有明显的抑制,这与 MTT 实验的结果一致,表明在宫颈癌细胞中 siR-GALNT7 具有抑制细胞增殖的作用。

肿瘤细胞侵袭实验是一种体外快速检测肿瘤细胞侵袭能力的方法,本文中主要是利用血清的浓度差,Matrigel 胶上面是无血清的培养液,滤膜下面是高浓度血清的培养液。本实验中转染 siR-GALNT7 的 HeLa 细胞和 C33A 细胞的侵袭能力亦受到明显的抑制,表明 siR-GALNT7 具有减弱宫颈癌细胞侵袭能力的作用。

细胞划痕实验是指将细胞种在培养皿或平板上,待细胞融合后用细胞刮在中央区域画一条线,这条线内的细胞被机械力去除了,然后将细胞继续培养,观察细胞向无细胞的划痕区域迁移的情况,来判断细胞的迁移能力。本文研究中转染 siR-GALNT7 的 HeLa 细胞的迁移能力较对照组亦有明显的抑制,表明 siR-GALNT7 具有减弱宫颈癌细胞迁移能力的作用。

糖基化转移酶由一个大的酶家族组成,是一组催化单糖类到核心蛋白,涉及寡糖和多糖的生物合成。之所以产生肿瘤相关抗原,原因之一就是糖基转移酶的异常表达,导致酶活性的改变以及对底物特异性的改变。异常糖基化在许多常见肿瘤中的肿瘤细胞生长、分化、黏附、转移以及肿瘤免疫监视方面起到了非常重要的作用。有些糖基转移酶是有用的肿瘤标记物。例如,GALNT3 可作为结肠癌可靠的诊断指标,在人类胰腺导管癌中过表达并且发挥了癌基因的作用^[9],此外,GALNT3 基因突变可以作为持续骨皮质增生症分子生物学研究中非常有用的鉴别诊断工具^[10]。Berois 等^[11]发现,GALNT6 是乳腺癌诊断的一个新的免疫组化标志物,并且认为 GALNT6 是乳腺癌发病的早期事件,可作为一个特异性标志物用于乳腺癌细胞扩散的分子诊断。GALNT13 可作

为分子标志诊断骨髓神经母细胞瘤^[12]。

最近的一项研究^[13]表明,miR-17 通过靶定 PTEN 和 GALNT7 来促进肝癌的发生发展。Gaziel-Sovran 等^[14]发现 miR-30b/30d 的高表达可以通过靶定 GALNT7 来促进黑色素瘤细胞的侵袭,导致免疫抑制细胞因子 IL-10 的合成增加,从而诱导免疫细胞活化和招募。本文通过 siRNA 诱导的 RNAi 明显抑制了 GALNT7 基因的表达,可以降低宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,逆转了宫颈癌细胞的恶性表型,尽管分子机制尚不明确,但是为宫颈癌基因治疗的临床应用开辟了新的思路。

4 参考文献

- 1 Ellenson LH, Wu TC. Focus on endometrial and cervical cancer. *Cancer Cell*, 2004, 5: 533-538.
- 2 Pushparaj PN, Aarthi JJ, Manikandan J, et al. siRNA, miRNA, and shRNA: in vivo applications. *J Dent Res*, 2008, 87: 992-1003.
- 3 Golden DE, Gerbasi VR, Sontheimer EJ. An inside job for siRNAs. *Mol Cell*, 2008, 31: 309-312.
- 4 Ten Hagen KG, Hagen FK, Balys MM, et al. Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27749-27754.
- 5 Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1473: 67-95.
- 6 Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, et al. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 473-482.
- 7 Chen X, Leung SY, Yuen ST, et al. Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 3208-3215.
- 8 张枝. RNA 干扰在妇科恶性肿瘤的研究应用进展. *四川医学*, 2010, 31: 124-126.
- 9 Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, et al. Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene*, 2011, 30: 4843-4854.
- 10 Gok F, Chefetz I, Indelman M, et al. Newly discovered mutations in the GALNT3 gene causing autosomal recessive hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome. *Acta Orthop*, 2009, 80: 131-134.
- 11 Berois N, Mazal D, Ubillos L, et al. UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 317-328.
- 12 Berois N, Blanc E, Ripoche H, et al. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem*,

2006, 52: 1701-1712.

13 Shan SW, Fang L, Shatseva T, et al. Mature miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce hepatocellular carcinoma by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways. J Cell Sci, 2013, 126: 1517-1530.

14 Gaziol-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. Cancer Cell, 2011, 20: 104-118.

(收稿日期: 2014-07-30)

(本文编辑: 陈淑莲)

消 息

第四届全国耳鼻咽喉科医师大会

由中国医师协会耳鼻咽喉科医师分会主办、《中国医学文摘耳鼻咽喉科学》杂志社承办的第四届全国耳鼻咽喉科医师大会将于 2014 年 10 月 30 日-11 月 1 日在北京国际饭店会议中心召开。

本次会议是 2014 年度全国耳鼻咽喉头颈外科的一次大型综合性学术会议, 是自中国医师协会耳鼻咽喉科医师分会成立以来的第 4 次全国学术盛会。

会议授予 I 类继续教育学分 10 分 [国家级继续医学教育项目: 2014-07-01-153(国)]。

1 征文要求

征文内容: 耳鼻咽喉头颈外科相关临床、基础、教学、维权及其他类文章的摘要。

征文要求: ①科学合理、真实可信、逻辑严谨、观点鲜明、文笔流畅; ②四段式(目的、方法、结果、结论)中英文摘要, 1000 字左右; ③题目不超过 20 字; ④依次列出全部作者姓名、单位, 标注通讯作者及其 E-mail; ⑤截稿日期: 2014 年 07 月 31 日。

投稿方向: ①大会发言, 入选讲者将在专业会场做 20 min 演讲; ②海报演讲, 入选讲者制作海报, 并在专业会场做 8 min 发言; ③海报展示, 仅在海报展示区展示海报; ④汇编收录, 入选论文摘要只被收录进汇编。注: 请自行制作尺寸为 90 cm×60 cm 的海报进行展示。

投稿方式: 用 Word 文档以附件形式发送至 cmdaent@aliyun.com。邮件标题请注明“全国耳鼻咽喉科医师大会征文”, 并在稿件上标注投稿方向。

所有投稿务必写清作者姓名、单位、邮编、手机号及 E-mail, 收到稿件后会务组将发送确认 E-mail。论文被选录后, 将向第一作者寄发会议邀请函。入选论文可在《中国医学文摘耳鼻咽喉科学》优先录用发表。

2 精品课程

课程参考国外会议设计, 本着精良、实用的原则, 讲者以临床实践为主要授课内容, 面向基层和青年耳鼻咽喉头颈外

科医师授课。2012 年第三届全国耳鼻咽喉科医师大会举办了第 1 期, 获得与会医师的好评。本届大会将继续开展该项目。

3 注册信息

7 月 31 日之前学生(本科、硕士)及基层医师 600 元/人, 普通医师 800 元/人; 7 月 31 日至报到当日学生(本科、硕士)及基层医师 800 元/人, 普通医师 1000 元/人。①早期注册时间以银行转账或邮局汇款时间为准; ②注册当天学生请出示学生证, 县乡级医师请出示工作证或在职证明。

早期注册汇款方式: ①银行转账。开户名: 《中国医学文摘耳鼻咽喉科学》杂志社; 开户行: 华夏银行股份有限公司北京东单支行; 账号: 4060 2000 0181 9400 0069 10。②邮局汇款。收款人地址: 北京市朝阳区广渠路 21 号金海商富中心 B 座 1415 室, 邮编: 100124; 收款人姓名: 《中国医学文摘耳鼻咽喉科学》杂志社; 附言: 第 4 届医师大会注册。

4 会议住宿

地址: 北京国际饭店(五星级, 北京市建国门内大街 9 号)。标准间(大床/双床)680 元/晚/间(含早餐, 含网络)。

由于会议召开时间不仅是北京旅游黄金季, 还是各种展会召开的旺季, 酒店房间非常有限, 请决定参会的医师尽早联系会务组预定房间, 并提前向会务组预交房费, 入住后发票由酒店开具。如不交纳房间预订费, 将不能保证入住会议酒店。房间预定也可仅交付第 1 天住宿费, 9 月 30 日之前取消预定退还 100% 费用, 10 月 1-15 日取消退还 50%, 10 月 15 日之后取消不退还费用。

房间预订汇款方式: 仅限邮局汇款。收款人地址: 北京市朝阳区广渠路 21 号金海商富中心 B 座 1415 室, 邮编: 100124; 收款人姓名: 《中国医学文摘耳鼻咽喉科学》杂志社; 附言: 医师大会住宿。

5 会务组联系方式

电 话: 010-59693660-802

E-mail: cmdaent@aliyun.com